临床研究

p53凋亡刺激蛋白2通过稳定β-catenin-E-cadherin复合体抑制骨肉细胞转移

郑少伟,钟浩博,缪海雄,刘伟乐,李胜发,陈楚群,孙春汉
惠州市第一人民医院骨科,广东 惠州 516001

摘要:目的 探讨p53凋亡刺激蛋白2(ASPP2)对骨肉瘤细胞转移的影响及其机制。**方法** Q-PCR检测骨肉瘤组织和细胞中ASPP2 mRNA的表达;western blot检测骨肉瘤细胞中ASPP2蛋白表达;transwell检测细胞转移能力;co-IP实验检测β-catenin和E-cadherin相互作用水平;免疫荧光检测β-catenin在细胞核中表达水平。**结果** 8例手术标本Q-PCR检测发现,骨肉瘤组织中ASPP2 mRNA的表达较癌旁组织明显降低;4株骨肉瘤细胞系中(OS187、SAOS2、HOS和MG63)ASPP2 mRNA和蛋白的表达较正常成骨细胞明显减少。过表达ASPP2蛋白的SAOS2其转移能力明显减弱,同时β-catenin和E-cadherin相互作用水平增加,而β-catenin核转位减少。**结论** ASPP2可以减少骨肉瘤细胞SAOS2的转移,其机制可能的通过稳定β-catenin-E-cadherin复合体,抑制β-catenin核转位。

关键词: p53凋亡刺激蛋白2;骨肉瘤转移;β-catenin-E-cadherin复合体;β-catenin核转位

ASPP2 inhibits osteosarcoma cells metastasis by stabilizing the β-catenin-E-cadherin complex

ZHENG Shaowei, ZHONG Haobo, MIAO Haixiong, LIU Weile, LI Shengfa ,CHEN Chuqun, SUN Chunhan
Department of Orthopedic Surgery, Huizhou First People's Hospital, Huizhou 516001, China

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of apoptosis stimulating protein2 of p53 (ASPP2) in osteosarcoma cells metastasis. **Methods** Quantitative-Polymerase Chain Reaction (Q-PCR) was performed to determine ASPP2 mRNA in eight samples of osteosarcoma tissue and four cell lines of osteosarcoma. The levels of ASPP2 protein were detected by western blot. The metastasis ability of SAOS2 cells that overexpressed ASPP2 were estimated by Transwell experiment. The Levels of interaction of β-catenin and E-cadherin were analyze by co-IP. Immunofluorescence was used to detect the expression of ASPP2 protein in the nuclear of osteosarcoma cells. **Results** The ASPP2 mRNA levels in eight osteosarcoma tissue samples were decreased significantly than that in normal bone tissue. Compared with normal human osteoblast cells HOSB, the levels of BRMS1 mRNA and protein obviously decreased in osteosarcoma cell lines OS187、SAOS2、HOS and MG63. The metastasis ability, β-catenin-E-cadherin complex and β-catenin nuclear-translocation of SAOS2 cells was significantly inhibited after ASPP2 overexpression. **Conclusion** BRMS1 can inhibit SAOS2 cells metastasis and the mechanism may involve with stabilizing the β-catenin-E-cadherin complex, and suppress β-catenin nuclear-translocation.

Keywords: apoptosis stimulating protein2 of p53; osteosarcoma cells metastasis; β-catenin-E-cadherin complex; β-catenin nuclear-translocation

骨肉瘤是易发生于长骨干骺端的原发性恶性肿瘤。由于骨肉瘤细胞生长迅速及易侵袭,即使骨肉瘤的规范化治疗通常采用手术前化疗、手术和术后定期化疗,即新辅助化疗加手术的综合治疗模式,治疗也强调多学科协作,但多数病人最终死于远处肺转移[1-2]。p53凋亡刺激蛋白2(ASPP2)是p53凋亡刺激蛋白家族的主要成员之一,参与细胞生长、凋亡以、损伤应激和细胞迁移等一系列生理病理反应[3-4]。研究表明,ASPP2可以稳定β-catenin-E-cadherin复合体,抑制β-catenin核转位,从而抑制肿瘤细胞的转移[5]。目前国内外尚无有关ASPP2在骨肉瘤中表达和骨肉瘤转移的研究。本研究主要观察ASPP2表达与骨肉瘤细胞转移的关系,为探讨ASPP2在骨肉瘤转移中的作用。

收稿日期:2016-10-21
作者简介:郑少伟,E-mail: 522948721@qq.com

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集8例发生转移的骨肉瘤男性病人的手术标本。正常成骨细胞及骨肉瘤细胞OS187、SAOS2、HOS、和MG63由南方医院骨科实验室赠予。SYBR Green Real-time PCR Master Mix和Trizol(TaKaRa,大连),抗人ASPP2单克隆鼠抗(Abcam,美国),β-catenin和E-cadherin兔多克隆抗体(CST,美国),人

β-actin鼠单克隆抗体(Santa Cruz,美国),过表达ASPP2质粒由上海吉玛生物公司合成,Lipofectamine® 2000(life,美国)。

1.2 人骨肉瘤手术标本收集和处理

收集人骨肉瘤组织及癌旁5 cm正常骨组织,新鲜组织用液氮预冷后的研磨碗研磨成粉末状,加入适量Trizol研磨后,−80 ℃保持。

1.3 质粒转染

由上海吉玛公司合成质粒。将SAOS2细胞悬液(细胞数约为2×10^5)接种于24孔板中,5%CO_2 37 ℃培养箱培养,等细胞融合度达到80%左右后,按Lipofectamine® 2000方法转染过表达ASPP2及对照组的质粒。转染质粒72 h后荧光显微镜下观察细胞荧光率。终浓度为0.2 μg/mL嘌呤霉素筛选稳定表达ASPP2细胞,收集部分细胞western blot检测ASPP2蛋白表达情况。

1.4 Q-PCR检测ASPP2 mRNA的含量

Trizol方法提人骨肉瘤组织或6孔板中RNA,用TAKARA反转录试剂盒及说明逆转成cDNA。生成的cDNA取2 μL,与10 μL 2×SYBR混合,再加入6 μL水和上、下游引物各1 μL(ASPP2引物: 上游,5-TATCTAATCCTTACCGAAACC-3; 下游,5-AACTAATACTCGGACTCCC-3。b-actin引物: 上游,5-GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA-3; 下游,5-CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC-3),混匀为20 μL反应体系,反应条件为95 ℃ 5 min;95 ℃ 15 s,60 ℃ 60 s,40个循环。ASPP2的表达水平用CT值(荧光信号达到设定阈值所经的循环数)表示,内参为GAPDH。

1.5 Western blot检测ASPP2蛋白水平

60 mm皿收集细胞,提取蛋白。5%浓缩胶80 V衡压30 min,10%分离胶恒压110 V,40 min,湿转120 mA恒流50 min,37 ℃摇床5%BSA封闭2 h,转印后加入一抗:ASPP2和β-actin 4 ℃过夜。TBST洗膜5 min×3次,山羊抗兔或山羊抗鼠近红外二抗1∶15000,常温避光摇床孵育1.5 h,避光TBST洗膜15 min×4次。Odyssey V3.0扫描仪扫描膜。重复3次。

1.6 Transwell实验

稳定表达ASPP2及resume细胞消化后用无血清培养基DMEM制成细胞悬液,调整细胞密度为5×10^4/mL。吸取200 μL细胞悬液加入Transwell小室上室,下室加入含10%血清的DMEM 600 μL。12 h后取出小室,去除培养基,4%多聚甲醛固定10 min后,结晶紫染色2 h,显微镜下拍照。

1.7 免疫荧光实验

将细胞种于confocal皿中,12 h后收集细胞,4%多聚甲醛固定10 min,PBS洗3 min×3次。1‰曲拉通通透细胞膜及核膜,β-catenin一抗1∶50 4 ℃孵育过夜。PBS洗3 min×3次,594红色荧光二抗常温1 h,DAPI 5 min,封闭拍照。

1.8 Co-IP实验

提取蛋白后,b-catenin抗体磁珠混合体4 ℃孵育4 h后,洗3次,加入适量2×loading buffer,100 ℃水浴10 min,Western blot检测β-catenin和E-cadherin。

1.9 统计学分析

应用SPSS 13.0统计学软件,采用单因素方差分析法,首先利用Levene方法进行方差齐性检验,确定方差齐性且整体比较组间差异有统计学意义后进一步作多重比较,多重比较采用LSD法,以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨肉瘤组织及细胞中ASPP2表达的水平

本研究收集了8例骨肉瘤病人及癌旁骨组织标本,用Q-PCR法检测了ASPP2 mRNA水平。结果显示,骨肉瘤组织(T)中ASPP2 mRNA较癌旁骨组织(N)明显减少。进一步对比了正常成骨细胞和骨肉瘤细胞(OS187、SAOS2、HOS和MG63)中ASPP2 mRNA和蛋白的表达差异,结果显示骨肉瘤细胞中的ASPP2 mRNA和蛋白较正常成骨细胞中的明显减少(图1)。

2.2 过表达ASPP2抑制HOS细胞侵袭

ASPP2是作为一个抑癌基因,其在骨肉瘤组织和细胞中表达明显减少。我们在低表达ASPP2的骨肉瘤细胞SAOS2中过表达ASPP2 (图2A),侵袭实验结果表明,过表达ASPP2后SAOS2侵袭能力受到明显抑制(图2B)。

2.3 ASPP2抑制β-cantein核转位

E-cadherin可以和β-cantein形成复合体,抑制β-cantein核转位。我们运用CO-IP实验检测了过表达ASPP2的SAOS2细胞中E-cadherin和β-cantein相互作用情况,结果显示过表达ASPP2后,E-cadherin和b-cantein相互作用明显增多(图3A)。同时观察到,过表达ASPP2的SAOS2细胞中,β-cantein核转位受到抑制(图3B)。

3 讨论

p53凋亡刺激蛋白家族包括:ASPPI、ASPP2和iASPP。因其能够与p53蛋白结合,调控p53促进凋亡基因转录的能力,调节肿瘤细胞凋亡而得名[3-4]。ASPP2是ASPP家族中最具特色的促凋亡蛋白[3]。在人脑胶质瘤、肺癌、乳腺癌、胃癌等常见肿瘤中,ASPP2的表达都明显下降[6-9]。临床研究也表明,ASPP2的表达水平也肿瘤患者的生存率也有一定的关联,高表达

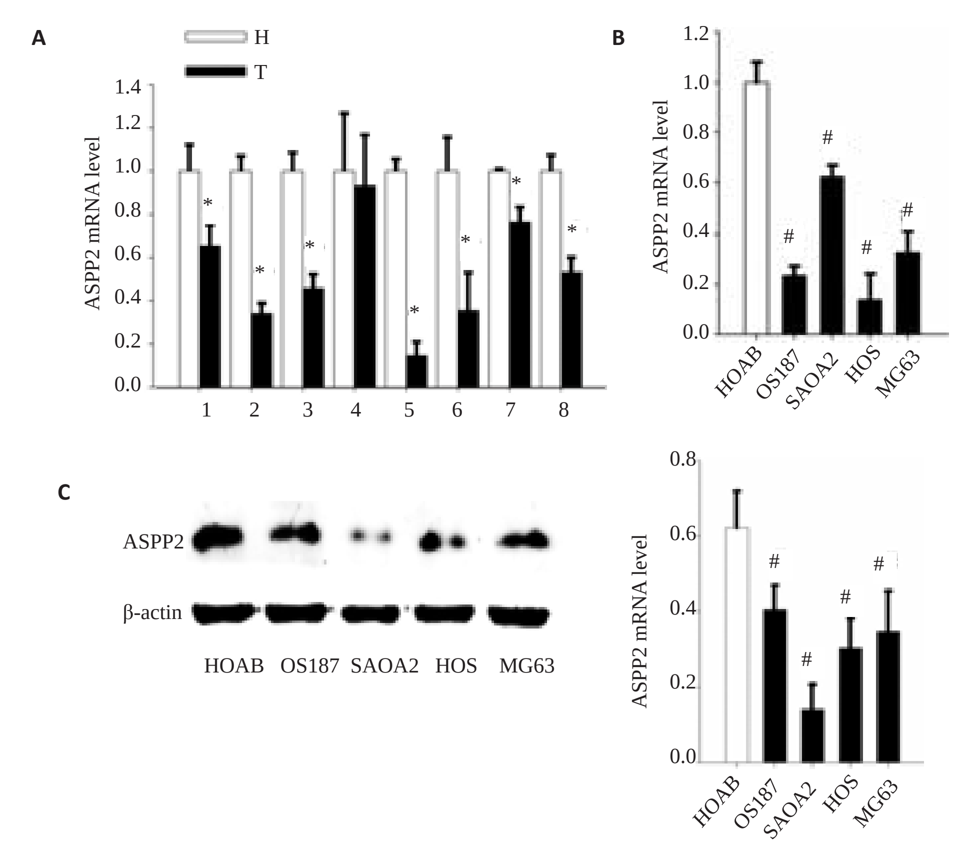


图1 骨肉瘤组织及细胞中ASPP2表达的水平

A: Q-PCR骨肉瘤组织中ASPP2 mRNA表达水平; ***B***: 细胞中ASPP2 mRNA表达水平; ***C***:Western blot检测骨肉瘤细胞中ASPP2蛋白表达水平. *P<0.05 *vs* N; #P<0.05 *vs* HOSB.

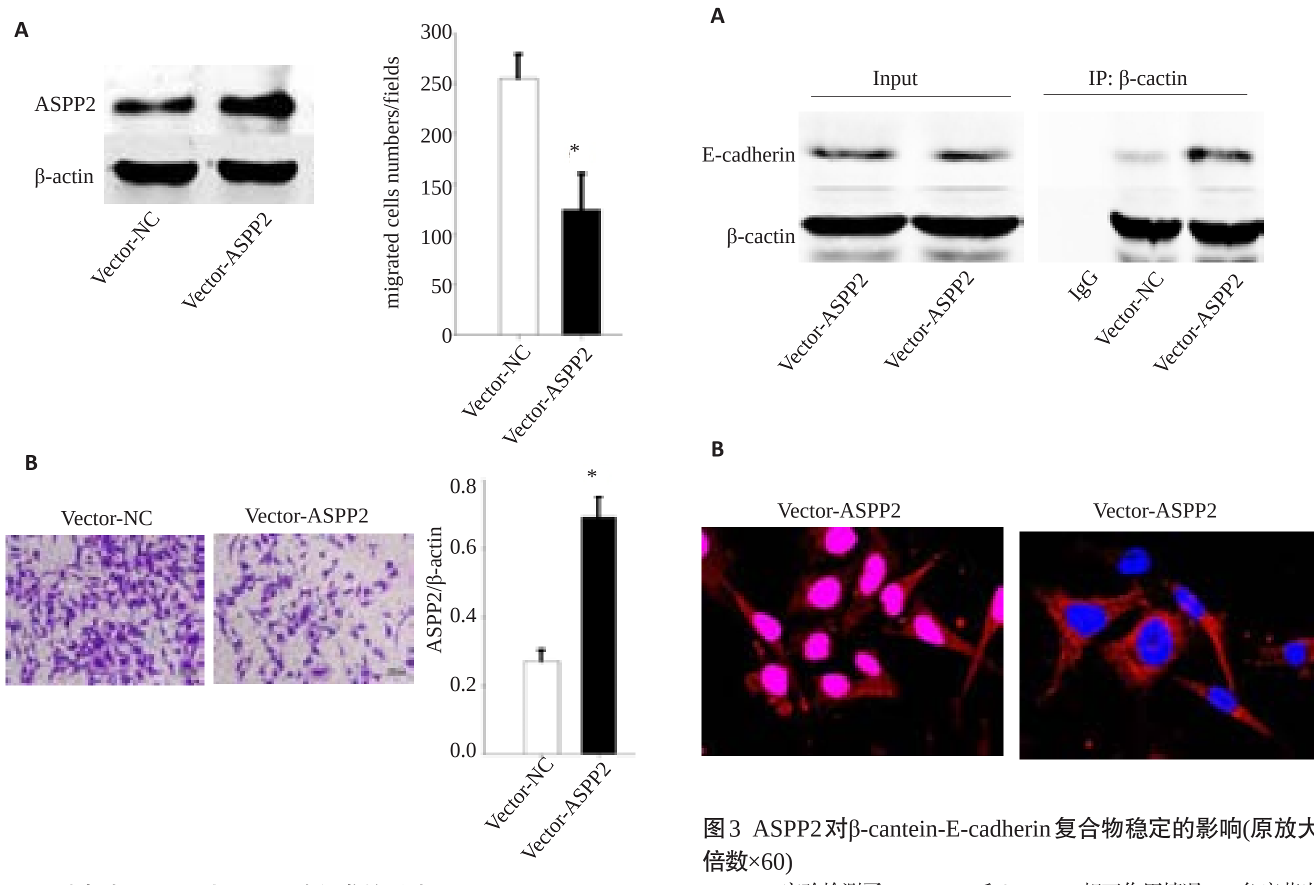


图2 过表达ASPP2对HOS细胞侵袭的影响

A: Western blot检测SAOS2细胞中ASPP2表达; ***B***:Transwell实验检测SAOS2细胞侵袭能力的变化. *P<0.05 *vs* vector-NC.

图3 ASPP2对β-cantein-E-cadherin复合物稳定的影响(原放大倍数×60)

A:CO-IP实验检测了E-cadherin和β-cantein相互作用情况; ***B***: 免疫荧光检测β-cantein核转位, β-cantein红色荧光, DAPI蓝色荧光.

ASPP2的患者预后较低表达的好[10]。本研究结果显示，骨肉瘤组织中ASSP2 mRNA的表达较癌旁骨组织明显降低，并且骨肉瘤细胞系中ASSP2 mRNA和蛋白表达也较正常成骨细胞明显减少。可见，ASSP2表达下降可能是影响骨肉瘤发生发展的一个重要因素。

大部分骨肉瘤患者预后不好的一个重要因素是发生了转移[11-12]。Mak等[13]发现在绒毛膜癌中抑制ASSP2表达，可以促进其发生转移。可见，ASPP2不仅参与调控细胞的凋亡，也对肿瘤细胞的转移有抑制作用。我们在低表达ASPP2的高转移性骨肉瘤细胞SAOS2过表达ASPP2，发现其转移能力明显减弱。由此提示，ASPP2对骨肉细胞的转移有一定抑制作用。那么，ASSP2是如何发挥抑制肿瘤转移的作用的?新近的研究也发现在乳腺癌细胞中ASPP2可以稳定β-catenin-E-cadherin形成复合体，从而减少乳腺癌细胞的转移[3]。E-cadherin和β-catenin形成复合体组成了细胞间的粘附的主要蛋白结构，可以增加细胞间的连接而减少肿瘤细胞的转移[14-15]；另一方面，E-cadherin和β-catenin形成复合体可以稳定β-catenin，减少β-catenin核转位促进肿瘤转移的作用[16-17]。，因此，我们进一步检测了ASPP2对β-catenin-E-cadherin复合体的影响，发现过表达ASPP2后，骨肉瘤细胞SAOS2中β-catenin-E-cadherin结合增多，并且核蛋白中β-catenin蛋白表达减少。由此可见，ASPP2也可以稳定骨肉瘤细胞中β-catenin-E-cadherin复合体，从而减少β-catenin核转位。

综上所述，骨肉瘤中ASPP2低表达与骨肉瘤细胞高转移能力有关，其可能的机制是ASPP2低表达后减少对β-catenin-E-cadherin复合体的稳定作用，β-catenin核转位后促进了骨肉瘤细胞的转移。

参考文献：

[1] Mirabello L, Troisi RJ, Savage SA. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program[J]. Cancer, 2009, 115(7): 1531-43.

[2] Posthumadeboer J, Witlox MA, Kaspers G, et al. Molecular alterations as target for therapy in metastatic osteosarcoma: a review of literature[J]. Clin Exp Metastasis, 2011, 28(5): 493-503.

[3] Vives V, Su J, Zhong S, et al. ASPP2 is a haploinsufficient tumor suppressor that cooperates with p53 to suppress tumor growth[J]. Genes Dev, 2006, 20(10): 1262-7.

[4] Samuels LY, O'connor DJ, Bergamaschi D, et al. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53[J]. Mol Cell, 2001, 8(4): 781-94.

[5] Wang YH, Bu FF, Royer C, et al. ASPP2 controls epithelial plasticity and inhibits metastasis through beta-catenin-dependent regulation of ZEB1[J]. Nat Cell Biol, 2014, 16(11): 1092-6.

[6] 朱泳鹏, 王东军, 何友虎. 人脑胶质瘤中ASPP1和ASPP2蛋白的表达及其与细胞凋亡的相关性[J]. 广东医学, 2012, 33(13): 1964-8.

[7] Li SJ, Shi GX, Yuan H, et al. Abnormal expression pattern of the ASPP family of proteins in human non-small cell lung cancer and regulatory functions on apoptosis through p53 by iASPP[J]. Oncol Rep, 2012, 28(1): 133-40.

[8] Sgroi DC, Teng S, Robinson G, et al. In vivo gene expression profile analysis of human breast cancer progression[J]. Cancer Res, 1999, 59(22): 5656-61.

[9] Meng WD, Chu RX, Wang BZ, et al. Helicobacter pylori infection and expressions of apoptosis-related proteins p53, ASPP2 and iASPP in gastric cancer and precancerous lesions[J]. Pathol Biol (Paris), 2013, 61(5): 199-202.

[10] 苏 敏, 谷 宇, 苏胜发, 等. p53凋亡刺激蛋白家族蛋白表达与非小细胞肺癌患者预后的关系[J]. 中华肿瘤杂志, 2014, 36(4): 268-72.

[11] Gozo MC, Jia DY, Aspuria PJ, et al. FOXC2 augments tumor propagation and metastasis in osteosarcoma[J]. Oncotarget, 2016, 7(42): 68792-802.

[12] Liu HL, Zhi LQ, Duan N, et al. Abnormal expression of Tim-3 antigen on peripheral blood T cells is associated with progressive disease in osteosarcoma patients[J]. FEBS Open Bio, 2016, 6(8): 807-15.

[13] Mak VC, Lee L, Siu MK, et al. Downregulation of ASPP2 in choriocarcinoma contributes to increased migratory potential through Src signaling pathway activation[J]. Carcinogenesis, 2013, 34(9): 2170-7.

[14] Chang YW, Su YJ, Hsiao M, et al. Diverse targets of beta-Catenin during the Epithelial-Mesenchymal transition define cancer stem cells and predict disease relapse[J]. Cancer Res, 2015, 75(16): 3398-410.

[15] Varisli L, Ozturk BE, Akyuz GK, et al. HN1 negatively influences the beta-Catenin/E-Cadherin interaction, and contributes to migration in prostate cells[J]. J Cell Biochem, 2015, 116(1): 170-8.

[16] Lee K, Lindsey AS, Li N, et al. Beta-catenin nuclear translocation in colorectal cancer cells is suppressed by PDE10A inhibition, cGMP elevation, and activation of PKG[J]. Oncotarget, 2016, 7(5): 5353-65.

[17] Jin RS, Liu WS, Menezes S, et al. The metastasis suppressor NDRG1 modulates the phosphorylation and nuclear translocation of beta-catenin through mechanisms involving FRAT1 and PAK4[J]. J Cell Sci, 2014, 127(14): 3116-30.